

# 海水鱼消化道菌群结构研究进展

周志刚<sup>1,2</sup> 石鹏君<sup>1</sup> 姚斌<sup>1</sup> 何夙旭<sup>1</sup> 苏永全<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>中国农业科学院饲料研究所, 北京 100081)

(<sup>2</sup>汕头大学海洋生物研究所, 515063)

(<sup>3</sup>厦门大学海洋与环境学院, 361005)

**摘要** 从海水鱼消化道结构、消化道菌群结构、消化道菌群功能及消化道菌群结构研究手段等几个方面综述了海水鱼消化道菌群结构的研究进展。指出海水鱼消化道菌群结构受到生长发育阶段、养殖环境及饵料变化等因素的影响。论述了正常消化道菌群的重要功能, 比较分析了目前消化道菌群结构不同研究手段, 阐明了消化道微生物分子生态研究的学术价值。为筛选高效、专一性、可定植性的海水鱼益生菌奠定了基础。

**关键词** 海水鱼 消化道 菌群结构

**中图分类号** X172; Q959.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2007)05-0123-09

## A review of the microflora structure in the digestive tract of marine finfish

ZHOU Zhi-gang<sup>1,2</sup> SHI Peng-jun<sup>1</sup> YAO Bin<sup>1</sup> HE Su-xu<sup>1</sup> SU Yong-quan<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>Feed Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

(<sup>2</sup>Marine Biology Institute, Shantou University, 515063)

(<sup>3</sup>Marine and Environment College, Xiamen University, 361005)

**ABSTRACT** This paper reviewed the research progresses of the microflora structure in digestive tract of marine finfish, including physiological structure of the digestive tract in marine finfish, the microflora structure in the digestive tract, the function of the microflora in the digestive tract, and the analysis means of the microflora structure in the digestive tract. It was pointed out in this paper that the microflora structure in digestive tract of marine finfish was affected by the developmental stage of the fish, aquaculture environment, variation of the diets, and so on. Besides, the key function of the normal microflora in the digestive tract and the different analysis means for the study of the microflora structure were discussed. Lastly, the academic values of studies on the molecular ecology of the microflora in the digestive tract were elucidated, aiming at providing reference for screening the efficient, special, and indigestinuous prebiotics for use in the culture of marine finfish.

**KEY WORDS** Marine finfish Digestive tract Microflora structure

国际科技合作重点计划项目(2004DF060800)、中国博士后科学基金项目(2005037625)、淡水生态与生物技术国家重点实验室开放课题(2005FB05)及广东省自然科学基金项目(05300945)共同资助

收稿日期:2006-04-28;接受日期:2006-06-30

作者简介:周志刚(1974-),男,副研究员,主要从事水产微生物分子生态研究。E-mail:zhouzhigang@caas.net.cn, Tel:(010)62136896

海水鱼养殖目前是我国水产养殖中最具生命力的部分,也是海洋生物资源利用的重要板块,但目前面临两个关键问题:(1)苗种培育成功率低,限制了海水鱼苗的供给及集约化养殖的发展;(2)病害防治所致的抗生素滥用(Zhou等 2004)。

影响海水仔稚鱼成活率的因素较多,部分归因于鱼体消化系统发育滞后于开口摄食,消化酶系不全或活性低,从而导致营养吸收不足而死亡,有效解决手段就是补充外源酶,而这一点可通过活饵或借助消化道菌群分泌来完成(Hansen *et al.* 1999; Gromez-Gil *et al.* 2000; Cahu *et al.* 2001; Venkat *et al.* 2004)。抗生素在水产养殖中使用存在着较严重的后果(华卫东等 2000; 姚建国等 2000):(1)抗生素在抑制、杀死有害菌的同时也杀死了有益菌。(2)滥用抗生素会诱发胃肠道细菌产生耐药性,使抗生素在实际应用中的效果越来越差,加大了抗生素的剂量。(3)抗生素在养殖产品中的残留直接威胁着人类的健康与安全。(4)破坏生态环境。海水鱼养殖中抗生素使用必将全面禁止,寻找高效抗生素替代品成为海水鱼养殖业发展研究的重点。

生态养殖无疑成为目前突破海水鱼养殖瓶颈的关键方式,而益生菌开发成为生态养殖中的重要手段(Olafsen 2001)。Sience 杂志于 1965 年最先报道了益生菌,也称益生素、促生素、利生素、微生态制剂等(Lilly *et al.* 1965),是指摄入动物体内参与肠内微生物平衡的具有直接通过增强动物对肠内有害微生物群落的抑制作用,或者通过增强非特异性免疫功能来预防疾病,而间接起到促进动物生长作用和提高饲料转化率的活性微生物培养物。水产养殖中,由于外来有益菌很难在水产动物消化道内存留及大量繁殖,借鉴畜禽思路所研制的水产益生菌存在着难定植的不足,其功能效应很难充分发挥(Panigrahi *et al.* 2004);益生菌直接添加到水体中亦存在一些隐患:(1)破坏水域中的微生态平衡。(2)利用效率低致使过度滥用。(3)作为海水鱼的主要养殖模式——网箱养殖无法施用。直接开发高效的可定植益生菌是必然发展趋势,并且按不同养殖阶段鱼体的不同生境与生理特征做高度专一性的研发(袁铁铮等 2004),但前提是必须对海水鱼消化道菌群结构有较全面的认识。

本文通过对海水鱼消化道微生物区系研究进展的简要述评,为筛选高效、专一及可定植的海水鱼益生菌奠定基础。

## 1 海水鱼消化道结构

消化道与消化腺构成鱼类的消化器官,完成鱼类对营养物质的消化吸收(林浩然 1999)。消化道是一条延长的管道,起自口,向后延伸经过腹腔,最后以泄殖腔或肛门开口于体外,包括口咽腔、食道、胃和肠等部分(林浩然 1999)。海水鱼类多为肉食性鱼,一般具有分化明显的胃,分为贲门部、盲囊部和幽门部 3 个部分,而肠道一般较短,约为体长的  $1/3 \sim 1/4$ ,形状多为直管或有的弯曲。鱼类消化道壁除口咽腔外,一般均由黏膜层、黏膜下层、肌层及浆膜层组成(冯晓燕 2001),其中黏膜层分布有大量黏液细胞,所分泌黏液物质的主要成分是酸性和中性黏多糖,此外含有多种蛋白质(Singh *et al.* 1974)。黏膜层及黏液多为消化道菌群的吸附位点(Hansen *et al.* 1999; Olafsen 2001),不同海水致病弧菌在大西洋鲑 *Salmo salar* Linnaeus 黏膜层所表现出来的定植能力差异可能与弧菌脂多糖糖端结构不同相关(Knudsen *et al.* 1999)。微生物定植差异性还与鱼体自身的免疫反应等有关(Harrell *et al.* 1976; Fletcher 1982),由于海水鱼益生菌的研究凸现了可定植性的重要性,而目前关于微生物在鱼体消化道内的定植机理以及不同菌株定植能力差异的研究报道还不多(Gizatulina *et al.* 1991)。就消化而言,一般有胃鱼类的食物消化主要是在胃中进行,肠段仅进一步消化由胃排空出来的已被基本消化了的食糜,肠道的主要功能在于吸收(冯晓燕 2001)。

## 2 海水鱼消化道菌群结构

正常情况下,海水鱼消化道存在着大量的细菌等微生物群落,构成了海水鱼消化道微生物区系,这些微生物群落是动物长期进化的结果,它们和机体的免疫功能、营养需求等都有着极其密切的关系(赵庆新 2001)。

鱼类消化道微生物包括好氧菌、兼性厌氧菌和专性厌氧菌,易受到水环境和饵料的影响(Trust *et al.* 1979; Sakata *et al.* 1980; Sugita *et al.* 1985; MacFarlane *et al.* 1986; Gatesoupe 1990; Harue *et al.* 1987),绝大多数细菌不能定植在消化道(非常住菌)。海水鱼类处于健康状态时,体内外环境会形成一个相对

稳定的微生物菌群间的动态平衡,如肠道的“弧菌肠道群”(Liston 1957),海水鱼肠道菌群数量与组成受鱼的种类、栖息水域、是否摄饵和投饵时间、饵料性质和生理状况等的影响(Stephen *et al.* 2002)。

## 2.1 不同生长发育阶段

海水鱼受精卵孵化后大致经历仔鱼、稚鱼、幼鱼及成鱼等几个生长发育阶段,了解不同发育阶段消化道菌群对于澄清海水鱼消化道微生物区系形成、认识“内源定植菌”(Indigenous microflora)具有重要意义。

海水仔鱼孵化后肠道微生物很快开始建立,主要是因为海水仔鱼为调节渗透压而不断饮水加快了这一过程,一些先锋菌由于适应仔鱼肠道小生境,大量繁殖并演变成消化道长住菌群(Hansen *et al.* 1999)。

而在孵化之前,鱼卵在排出体内进入水体几个小时之后其表面就覆盖很多微生物。鱼卵表面的菌群结构在一定程度上反映了水体微生物的组成;而这些附生菌也可能影响到水环境中的微生物区系,甚至对鱼卵造成破坏(Hansen *et al.* 1999)。

不同生长发育阶段海水鱼肠道微生物的差异更多与其特定阶段饵料及栖息环境中的微生物结构相关。夏鲆 *Paralichthys dentatus* 仔鱼消化道微生物区系主要受活饵菌群的影响,只是在仔鱼变态期及后期才形成稳定的内源性微生物区系(A stable indigenous microbiota),但在此之前水环境与鱼消化道之间的细菌存在着明显更替(Succession)(Stephen *et al.* 2002)。大西洋大比目鱼 *Hippoglossus hippoglossus* 消化道细菌在仔鱼卵黄囊阶段(摄食前)以假单胞菌属为主,而在开口仔鱼阶段被弧菌统治,主要是与活饵相关的一些弧菌,尤其以灿烂弧菌 *Vibrio splendidus* 及溶藻酸弧菌 *V. alginolyticus* 型居多,但是,并非全部活饵关联的细菌均能定植在大比目鱼肠道中,另外机会菌也可能侵入肠道,成鱼肠道则以发光菌 *Photophosphoreum* 为优势菌(Verner-Jeffreys *et al.* 2003)。真鲷 *Pagrus major*、鲈 *Percichthyidae* 仔鱼在摄食轮虫时,肠道以鳗弧菌 *Vibrio anguillarum*、塔氏弧菌 *Vibrio tubiashii* 与非弧菌种占多,而在摄食卤虫时,溶藻酸弧菌 *Vibrio alginolyticus*、解蛋白弧菌 *Vibrio proteolyticus*、哈氏弧菌 *Vibrio harveyi* 与需钠弧菌 *Vibrio natriegens* 则成为主导菌,仔鱼阶段没有细菌能定植在肠道上,肠道细菌组成只反映食物细菌的组成,只是仔鱼期结束时,弧菌才成为肠道定植的优势菌(Grisez *et al.* 1997)。

不同海水鱼在不同发育阶段所检测到的菌群结构见表 1(Hansen *et al.* 1999),几乎所有海水鱼肠道优势菌均有弧菌或假单胞菌,反应了海水中的优势菌群结构。

表 1 海水鱼肠道优势菌群<sup>\*</sup>

Table 1 Predominant bacteria in the intestine of marine fish species

| 鱼<br>Fish species                           | 发育阶段<br>Developmental stage                                 | 肠道优势菌群<br>Predominant intestinal bacteria  |
|---|---|--|
| 大西洋鳕<br><i>Gadus morhua</i>                 | 仔鱼/稚鱼(Strøm <i>et al.</i> 1990)                             | 弧菌 <i>Vibrio</i> , 乳酸菌 <i>Lactobacillus</i> , 芽孢杆菌 <i>Bacillus</i>   |
|   | 成鱼(Lindsay <i>et al.</i> 1985; Onarheim <i>et al.</i> 1994) | 弧菌 <i>Vibrio</i> , 发光菌 <i>Photobacterium phosphoreum</i> , <i>Pseudomonas nautical</i> , 腐败交替单胞菌 <i>Alteromonas putrefaciens</i> , <i>Vibrio iliopiscarius</i> |
| 鲱<br><i>Clupea harengus</i>                 | 仔鱼(Hansen <i>et al.</i> 1992)                               | 假单胞菌 <i>Pseudomonas</i> / 异单胞菌 <i>Alteromonas</i> , 黄杆菌 <i>Flavobacterium</i>  |
| 大西洋大比目鱼<br><i>Hippoglossus hippoglossus</i> | 卵黄囊(Bergh <i>et al.</i> 1994)                               | 嗜纤维菌 <i>Cytophaga</i> / <i>Flexibacter</i> / 黄杆菌 <i>Flavobacterium</i> , 假单胞菌 <i>Pseudomonas</i>   |
|   | 仔鱼(Bergh <i>et al.</i> 1994)                                | 弧菌 <i>Vibrio</i> / 气单胞菌 <i>Aeromonas</i>   |

(续表 1)

| 鱼<br>Fish species                       | 发育阶段<br>Developmental stage                                       | 肠道优势菌群<br>Predominant intestinal bacteria   |
|---|---|---|
| 大菱鲆<br><i>Scophthalmus maximus</i>      | 仔鱼 (Gatesoupe 1990; Blanch <i>et al.</i> 1997)                    | 弧菌 <i>Vibrio</i> spp.<br>(河流弧菌 <i>V. fluvialis</i> , 溶藻弧菌 <i>V. alginolyticus</i> , <i>V. Pelagius</i> , 大菱鲆弧菌 <i>V. scophthalmi</i> , 灿烂弧菌 <i>V. splendidus</i> , 副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i> ), 产气单胞菌属 <i>Aeromonas</i> spp., 嗜水性产气单胞杆菌 <i>A. hydrophila</i> , 乙酸钙不动杆菌 <i>Chromobacterium violaceum</i> , 无色杆菌属 <i>Achromobacter</i> sp., 醋酸钙不动杆菌 <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , 荧光假单胞菌 <i>Pseudomonas fluorescens</i> , 恶臭假单胞菌 <i>P. putida</i> |
| 鮨<br><i>Seriola quinqueradiata</i>      | 成鱼 (Sakata <i>et al.</i> 1978)                                    | 弧菌属 <i>Vibrio</i> , 黄杆菌属 <i>Flavobacterium</i> , 气单胞菌属 <i>Aeromonas</i>   |
| 欧洲鲷<br><i>Solea solea</i>               | 卵黄囊/变形阶段仔鱼 (Campbell <i>et al.</i> 1983)                          | 假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i> /产碱杆菌属 <i>Alcaligenes</i> , 弧菌属 <i>Vibrio</i> /非产气单胞菌属 <i>Anaerogenic aeromonas</i> , 莫拉克氏菌属 <i>Moraxella</i>  |
|   | 稚鱼/成鱼 (Campbell <i>et al.</i> 1983; MacDonald <i>et al.</i> 1986) | 弧菌属 <i>Vibrio</i> /非产气单胞菌属 <i>Anaerogenic aeromonas</i> , 莫拉克氏菌属 <i>Moraxella</i> , 黄杆菌属 <i>Flavobacterium</i> , 产碱杆菌 <i>Alcaligenes</i> , 发光细菌 <i>Photobacterium</i> , 微球菌 <i>Micrococcus</i> , 葡萄球菌 <i>Staphylococcus</i>   |
| 真鲷<br><i>Pagrus major</i>               | 仔鱼/稚鱼 (Muroga <i>et al.</i> 1987)                                 | 弧菌属 <i>Vibrio</i> , 假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i> , 肠杆菌属 <i>Enterobacteriaceae</i> , 粘纤维菌属 <i>Cytophaga</i> , 气单胞菌属 <i>Aeromonas</i>   |
| 黑鳍棘鲷<br><i>Acanthopagrus schlegelii</i> | 仔鱼/稚鱼 (Muroga <i>et al.</i> 1987)                                 | 弧菌属 <i>Vibrio</i> , 假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i> , 肠杆菌属 <i>Enterobacteriaceae</i> , 粘纤维菌属 <i>Cytophaga</i> , 气单胞菌属 <i>Aeromonas</i>   |
| 条纹石鲷<br><i>Morone saxatilis</i>         | 稚鱼 (MacFarlane <i>et al.</i> 1986)                                | 弧菌属 <i>Vibrio</i> , 气单胞菌属 <i>Aeromonas</i> , 黄杆菌属 <i>Flavobacterium</i> , 肠杆菌属 <i>Enterobacteriaceae</i> , 假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i>   |
|   | 成鱼 (MacFarlane <i>et al.</i> 1986)                                | 气单胞菌属 <i>Aeromonas</i> , 假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i> , 肠杆菌属 <i>Enterobacteriaceae</i> , 弧菌属 <i>Vibrio</i>  |
| 牙鲆<br><i>Paralichthys olivaceus</i>     | 仔稚鱼 (Tanaasomwang <i>et al.</i> 1989)                             | 弧菌属 <i>Vibrio</i> , 假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i>  |

\* 优势菌按数量递减顺序列出

淡水鲤科鱼类如鲤鱼 *Cyprinus carpio* (杨雨辉等 2003)、草鱼 *Ctenopharyngodon idellus* (周文豪等 1998) 肠道菌群的数量具有从前肠至后肠逐渐增多的现象。这可能是由于肠道内容物由前向后推进的缘故,也可能是后肠肠道内容物及其环境更有利于微生物的生长繁殖(杨雨辉等 2003)。海水鱼肠道菌群分布是否也具有同样趋势尚待研究,另外海水鱼消化主要集中在胃部(冯晓燕 2001),而有关胃的微生物区系也鲜有报道。即使以肠道为研究对象,几乎所有的研究都以肠道内容物或包含食糜的肠管为研究对象,对肠壁菌群的研究极少,而肠壁菌群才是真正意义上的定植菌群,并且绝大多数研究均采用常规的人工培养方法,存在较大缺陷,亟待重新检测。外来菌能否定植在消化道是成为优势菌的决定因素, Gatesoup 等(1998)认为在健康动物中正常的优势菌或次优势菌可以作为益生菌的来源。

## 2.2 养殖环境差异

集约化养殖的真鲷 *Pagrus major* 及黑鲷 *Sparus macrocephalus* 肠道以弧菌属(ca. 45 %)与假单胞菌属

(30%)为主,而水体优势菌为假单胞菌属(22%)及莫拉克氏菌属(29%),活饵中为假单胞菌属(48%),弧菌属在水体与活饵中各7%与11%(Muroga 1987)。表明虽然海水鱼肠道优势菌在一定程度上反应了海水中优势菌群的结构,但海水鱼肠道对环境来源的微生物存在明显选择性。

另外,海水与淡水养殖条件下红杂交罗非鱼肠道优势菌亦存在差异(Leamaster *et al.* 1997),杉田等(1982)将尼罗罗非鱼逐渐由淡水转入海水中饲料后发现肠道内专性厌氧细菌减少或消失(李静 2003),养殖在淡水和海水中鲮鱼肠道细菌种类亦存在差别(Hamid *et al.* 1978),淡水鲮鱼肠道细菌主要是肠细菌属、芽孢菌属、微球菌属,而海水中优势菌为弧菌属、假单胞菌属和气单胞菌属。

水环境的温度变化会引起细菌数量的变化(Leamaster *et al.* 1997)。杂交罗非鱼在水温从26℃下降到18℃时引起了肠道弧菌明显增加,由于某些弧菌为鱼类的致病菌,这一发现显得非常有意义(Austin *et al.* 1993);南美白对虾 *Penaeus vannamei* 肠道中厌氧菌总数、*Bifidobact* sp. 随水温升高显著增加,好氧菌总数、*Lactobacillus* sp. 随水温升高变化不显著(尹军霞等 2004)。有关水温变化引起海水鱼消化道菌群变化的研究鲜有报道,值得探讨。

不同季节罗非鱼肠道细菌的种类及数量变化很大(Al-Harbi *et al.* 2004)。白鲢、鲤鱼 *Cyprinus carpio*、斑点叉尾鮰及鲫鱼肠道乳酸菌同样随季节变化而发生改变(Hagi *et al.* 2004),主要与水温变化相关。海水鱼中没有见到系统研究报道。

### 2.3 饵料变化

鱼类由于食性不同,许多外界微生物转移到体内,形成各种不同的菌群。肉食性鱼类肠道内除一些正常菌群外,含有较多的链球菌和厌氧芽孢杆菌;植物性食性鱼类肠道内则有较多的嗜酸乳杆菌和双歧杆菌;杂食性食性鱼类肠道内以弧菌和气单胞菌占优势(Harue *et al.* 1985)。酵母菌、霉菌也常在鱼类肠道中发现(王红宁等 1994)。

海水养殖品种大多属肉食性鱼,在摄食饵料变化的同时,消化道菌群也做出适应性改变。日本牙鲆 *Paralichthys olivaceus* 稚鱼摄食活饵时以气单胞菌属、莫拉克氏菌属及弧菌属为主,而在摄食人工饲料后,则以气单胞菌属、芽孢杆菌、*Coryneforms*、莫拉克氏菌属、假单胞菌属及弧菌为主(Sugita *et al.* 2002)。稚鲍 *Haliotis discus hannai* 肠道微生物区系由于摄食微藻,与海水细菌一致;4个月后,在饵料变为藻类后,改变为兼性厌氧菌-褐藻酸降解菌,优势菌为 *Alginateolytic, non-motile fermenters* (NMF)及弧菌属;1年后,微生物区系趋于稳定,NMF占主导,96%NMF为 *Vibrio halioticoli* (Tanaka *et al.* 2003)。

禁食对鱼肠道菌有影响(Margolis 1953),饥饿导致比目鱼肠道微生物为维持生存而减少细胞体积(Conway 1986)。大多数抗生素添加对鱼类的肠道菌群有影响,但不同的抗生素对肠道菌群的影响程度不同(Olafsen 2001;杨雨辉 2003)。

## 3 消化道菌群功能

健康海水鱼消化道优势菌群对机体正常生命活动起着重要作用,其作用途径主要包括以下几个方面:

(1)分泌胞外酶,分解蛋白、脂肪及糖类营养物质。由淡水鱼(香鱼 *Plecoglossus altivelis*、鲤鱼、斑点叉尾鮰 *Ictalurus punctatus*、日本鳗 *Anguilla japonica* 及罗非鱼 *Tilapia*)肠道优势菌群分泌的淀粉酶在一定程度上对淀粉的消化吸收起重要作用(Sugita *et al.* 1997)。印度野鲮 *Labeo Rohita* 在添加分泌蛋白酶的细菌 *Bacillus circulans* (Lr 1.1)后,生长及饲料转化效率均得到改善(Ghosh *et al.* 2003)。因为苗种阶段消化道功能尚不完善,一些肠道益生菌的添加有助于提高海水鱼苗及虾苗的成活与生长(Gomez-Gil *et al.* 2000; Cahu *et al.* 2001; Venkat *et al.* 2004),这一点在养殖实践中意义重大。但海水鱼中相关报道少见。

(2)合成维生素。如双歧杆菌能够合成维生素B、大肠杆菌能合成维生素K以及链球菌能合成维生素C等。*Bacteroides* type A与淡水鱼肠道生物素产生紧密相关(Sugita *et al.* 1991),而斑点叉尾鮰 *Ictalurus punctatus* 肠道细菌没有很强的合成生物素的能力(Lovell *et al.* 1984)。海水鱼相关研究较少。

(3)合成短链脂肪酸(SCFA)。它是细菌发酵的主要产物,包括乙酸、丙酸、丁酸。它可以在结肠被迅速吸

收提供给机体能量,促进水、盐的吸收(李 静 2003)。海水鱼中未见报道。

(4)分泌肠毒素、酸菌素(Acidoline)等。在日本牙鲆研究中,肠道中一些细菌具抗菌活性,对机体抗病起重要作用(Sugita *et al.* 2002)。一些从消化道中分离的乳酸杆菌也起到同样的作用(Gildberg 等 1997; Ringo *et al.* 1998)。

#### 4 消化道菌群结构研究手段

海水鱼消化道存在大量微生物群落,是海水鱼微生态环境的重要成分,有报道海水鱼肠道细菌数  $1.12 \times 10^5 \sim 1.45 \times 10^6$  CFU/g、放线菌  $1.0 \times 10^3 \sim 8.2 \times 10^3$  CFU/g 以及真菌数  $1.0 \times 10^3 \sim 2.1 \times 10^4$  CFU/g(胡申才等 2005);而尾崎久雄(1985)认为海水鱼肠内细菌数量在  $10^6 \sim 10^8$  CFU/g,甚至略高于淡水鱼肠道细菌数  $10^5 \sim 10^8$  CFU/g(Sugita *et al.* 1983)。Smith 早在 20 世纪 30 年代开始探讨鱼类细菌,从 50 年代开始研究鱼类肠道细菌(Liston 1957;Margolis 1953),相关报道非常丰富。

然而,一方面这些研究过多集中在细菌上,而忽略了对消化道真菌的探讨(肖克宇等 2004),主要是因为真菌难培养,实际是酵母菌为许多鱼肠道优势菌(王红宁 1994),并且一些肠道菌群的重要功能是通过真菌来完成的(汤伏生等 1994)。一方面,这些研究大多以肠道内容物或包含食糜的肠管为研究对象,而较少单独关注肠壁菌群。有研究表明,肠壁菌群结构显著性区别于肠道内容物菌群,并且非常稳定,是真正意义上的可定植菌群(尹军霞等 2004)。另一方面,这些研究均依据常规的人工培养法,存在一定局限性(冯仰廉 2004):(1)自然界很多微生物不能人工培养;(2)绝大多数严格厌氧微生物尚未得到鉴定和描述;(3)人为培养的微生物与其自然界菌体在形态和特征上差异显著;(4)操作过程繁冗(Ji *et al.* 2004)。例如:水环境(海水、淡水、中营养湖泊)可培养细菌占总数仅 1%(Amann *et al.* 1995);鱼体表可培养微生物更不足总量 0.01%(Bernadsky *et al.* 1992);虹鳟肠道细菌 50%~89%无法培养,可培养细菌中亦有 20%无法定性分析(Huber *et al.* 2004)。可以推断,常规的人工培养法无法获取海水鱼消化道菌群的全面信息。

基于 DNA 指纹技术的分子生物学研究手段,如限制性片段长度多态性分析(RFLP)、末端限制性片段长度多态分析(T-RFLP)(Liu *et al.* 1997)、单链构象多态性分析(SSCP)(宫曼丽等 2004)等逐渐被引入到环境生态研究中,逐步克服常规人工培养法的不足。其中,变性梯度凝胶电泳(DGGE)(Muyzer *et al.* 1993)和温度梯度凝胶电泳(TGGE)技术直接利用 DNA 或 RNA 对微生物遗传特性进行表征,不但避免了传统培养法的繁冗,更可进而鉴定出常规平板技术无法分离出的菌种(宫曼丽等 2004)。这一技术所分析出的微生物群落多样性使我们能够快速、准确地鉴定自然生境或人工生境中的微生物个体,并进行复杂微生态演替规律、微生物种群动态性、重要基因定位、表达及调控的评价分析(马悦欣等 2003)。

在细菌的 16S rDNA 中有多个区段高度保守,根据这些保守区人们可以设计出细菌的通用引物,可以用来扩增出所有细菌的 16S rDNA 片段,并且这些引物仅对细菌是特异的,也就是说这些引物不会与非细菌的 DNA 互补,而细菌的 16S rDNA 可变区的差异可以用来区分不同的菌。因此,16S rDNA 可以作为细菌群落结构分析最常用的系统进化标记分子(刘年锋 2004)。而真菌的标记分子则为 18S rDNA。

Huber 等(2004)用分子微生态研究手段在所有虹鳟肠道样本中均检测出 *Carnobacterium piscicola*、*Clostridium botulinum*、*Anaerofilum pentosovorans* 等常规培养法未发现的优势菌株。结合 PCR 的变性梯度凝胶电泳技术(DGGE)已在土壤、人粪、猪胃肠道、瘤胃、昆虫消化道、海绵、虾等的菌群研究中得到应用,中国农科院饲料研究所也成功应用到系统研究奥尼罗非鱼肠道及石斑鱼等优势菌群结构研究中,有效克服了人工培养法的局限性。PCR-DGGE 技术主要包括样品总 DNA 提取、引物及探针的设计、PCR 扩增、梯度凝胶电泳、基因文库的筛选、序列测定、序列分析等,但目前在微生物 DNA 高效提取、引物设计、变性梯度凝胶电泳技术(DGGE/TGGE)、优势菌群定量分析等关键环节尚待进一步完善。

在水产养殖中,利用 PCR-DGGE 技术可建立不依赖常规分离培养的病原菌分子诊断技术、基于机体内优势菌群结构的健康水产动物评价技术,并可用于研究养殖品种与养殖水体以及底泥中微生物的关系、食物链等,尤其关键的是 PCR-DGGE 奠定了海水鱼可定植益生菌开发的技术基础(李志勇等 2005)。

## 参 考 文 献

- 马悦欣, Holmström, C., Webb, J., Staffan, K. 2003. 变性梯度凝胶电泳(DGGE)在微生物生态研究中的应用. 生态学报, 23(8):1561~1569
- 尹军霞, 张建龙, 沈文英, 石巧红, 顾海凤. 2004. 鱼食性与肠道菌群关系的初步研究. 水产科学, 23(3):4~6
- 王红宁, 胡廷秀, 何明清, 柳 萍. 1994. 微生物添加剂饲喂鲤鱼肠道菌群的变化研究. 四川农业大学学报, 12(增刊):654~657
- 冯仰廉. 2004. 反刍动物营养学. 北京:科学出版社, 114~130
- 冯晓燕. 2001. 许氏平鲉(*Sebasteschlegeli*)消化道组织学、组织化学及酶学研究. 见:青岛海洋大学硕士学位论文
- 刘年锋. 2004. 16S rDNA 技术及在水产养殖细菌分析中的应用前景. 现代渔业信息, 19(12):6~8
- 华卫东, 王亚军, 董雪梅, 高顺宾, 张建东, 吴天星. 2000. 百福素( )对断奶仔猪生产性能和经济效益的影响. 浙江农业学报, 12(5):268~271
- 汤伏生, 朱晓燕, 张兴忠. 1994. 鲤鱼肠道细菌及其淀粉酶对宿主消化的影响. 水产学报, 18(3):177~182
- 尾崎久雄. 1985. 鱼类消化生理. 上海:上海科学技术出版社
- 李 静. 2003. 草鱼肠道菌群的变化和免疫机能的关系. 见:华中农业大学硕士学位论文
- 李志勇, 何丽明, 吴 杰, 陈集杰. 2005. 基于 PCR-DGGE 基因指纹的对虾体内优势细菌的组成分析. 微生物学通报, 32(3):82~86
- 杨雨辉, 佟恒敏, 卢彤岩, 赵吉伟, 李晓霞, 王 君. 2003. 乳酸环丙沙星对鲤鱼肠道菌群的影响. 中国兽医杂志, 39(10):38~40
- 肖克宇, 陈昌福. 2004. 水产微生物学. 北京:中国农业出版社, 154~157
- 周文豪, 陈孝煊, 张冬晓, 陈昌福. 1998. 摄食不同饵料对草鱼肠道菌群影响的研究. 华中农业大学学报, 17(3):252~256
- 林浩然. 1999. 鱼类生理学. 广州:广东高等教育出版社
- 姚建国. 2000. 化学维生素和益生菌在动物营养中的应用. 粮食与饲料工业, 7:34~36
- 宫曼丽, 任南琪, 邢德峰. 2004. DGGE/TGGE 技术及其在微生物分子生态学中的应用. 微生物学报, 44(6):845~848
- 胡申才, 谭仁祥, 洪 葵. 2005. 海洋微生物及其产生的生物活性物质的研究进展. 第三届海洋生物高技术论坛论文集(下册), 6~13
- 赵庆新. 2001. 鲤科(Cyprinidae)鱼肠道菌群分析. 微生物学杂志, 21(2):18~20
- 袁铁铮, 姚 斌. 2004. 分子水平上益生菌研究进展. 中国生物工程杂志, 24(10):27~33
- Al-Harbi, A. H., and Uddin, M. N. 2004. Seasonal variation in the intestinal bacterial flora of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*) cultured in earthen ponds in Saudi Arabia. Aquaculture, 29:37~44
- Amann, R. I., Ludwig, W., and Schleifer, K. H. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiological Reviews, 59:143~169
- Austin, B., and Austin, D. A. 1993. Bacterial fish pathogens: Disease in farmed and wild fish, 2nd edn. New York: Ellis Horwood
- Bergh, Ø., Naas, K. E., and Harboe, T. 1994. Shift in the intestinal microflora of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) larvae during first feeding. Can. J. Fisheries Aquat. Sci. 51:1899~1903
- Bernadsky, G., and Rosenberg, E. 1992. Drag-reducing properties of bacteria from the skin mucus of the cornefish (*Fistularia commersonii*). Microbial Ecology, 24:63~74
- Blanch, A. R., Alsina, M., Simon, M. *et al.* 1997. Determination of bacteria associated with reared turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae. J. Appl. Microbiol. 82:729~734
- Cahu, C., and Infante, J. Z. 2001. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. Aquaculture, 200:161~180
- Campbell, A. C., and Buswell, J. A. 1983. The intestinal microflora of farmed dover sole (*Solea solea*) at different stages of fish development. J. Appl. Bacteriol. 55:215~223
- Conway, P. L., Maki, J., Mithchell, R. *et al.* 1986. Starvation of marine flounder, squid and laboratory mice and its effect on the intestinal microbiota. FEMS Microbiology Letters, 38(3):187~195
- Fletcher, T. C. 1982. Non-specific defence mechanisms in fish. Develop. Comp. Immunol. suppl.:123~132
- Gatesoupe, F. J. 1990. The continuous feeding of turbot larvae, *Scophthalmus maximus*, and control of the bacterial environment of rotifers. Aquaculture, 89:139~148
- Gatesoupe, F. J., and Lesel, R. 1998. An environmental approach to intestinal microflora in fish. Cahiers Agricultures, 7(1):29~35
- Ghosh, K., Sen, S. K., and Ray, A. K. 2003. Supplementation of an isolated fish gut bacterium, *Bacillus Circulans*, in formulated diets for rohu, *Labeo Rohita*, fingerlings. The Israeli Journal of Aquaculture, 55(1):13~21
- Gildberg, A., Mikkelsen, H., Sandaker, E. *et al.* 1997. Probiotic effect of lactic acid bacteria in the feed on growth and survival of fry of Atlantic cod (*Gadus morhua*). Hydrobiologia, 352:279~285
- Gizatulina, S. S., Birger, M. O., Kulnich, L. I. *et al.* 1991. A method for assessing the microfloral status of the human intestines by the quantity of adhesion-active bacteria and by the type of adhesions. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol, 4:21~23
- Grisez, L., Reyniers, J., Verdonck, L. *et al.* 1997. Dominant intestinal microflora of sea bream and sea bass larvae, from two hatcheries, during larval development. Aquaculture, 155:387~399

- Gomez-Gil, B., Roque, A., and Turnbull, J. F. 2000. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture*, 191:259~270
- Hagi, T., Tanaka, D., Iwamura, Y. *et al.* 2004. Diversity and seasonal changes in lactic acid bacteria in the intestinal tract of cultured freshwater fish. *Aquaculture*, 234:335~346
- Hamid, A., Sakata, T., and Kakimoto, D. 1978. Microflora in the alimentary tract of Gray Mullet-A comparison of the Mullet intestinal microflora in fresh and sea water. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 44(1):53~57
- Hansen, G. H., Strøm, E., and Olafsen, J. A. 1992. Effect of different holding regimes on the intestinal microflora of herring (*Clupea harengus*) larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:461~470
- Hansen, G. H., and Olafsen, J. A. 1999. Bacterial interactions in early life stage of marine cold water fish. *Microbial Ecology*, 38:1~16
- Harrell, L. W., Etlinger, H. M., and Hodgins, H. O. 1976. Humoral factors important in resistance of salmonid fish to bacterial disease. . . . *Anti-Vibrio anguillarum* activity in mucus and observations on complement. *Aquaculture*, 7:363~370
- Harue, S., and Margolis, L. 1985. The intestinal microflora of carp *Cyprinus carpio*, grass carp, *Ctenopharyngodon idellus* and tilapia *Oreochromis niloticus*. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 51(8):1 325~1 329
- Harue, S., and Margolis, L. 1987. Comparison of microflora between intestinal contents and fecal pellets of freshwater fishes. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 51(8):1 325~1 329
- Huber, I., Spanggaard, B., Appel, K. F. *et al.* 2004. Phylogenetic analysis and in situ identification of the intestinal microbial community of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Journal of Applied Microbiology*, 96:117~132
- Ji, N., Peng, B., Wang, G. *et al.* 2004. Universal primer PCR with DGGE for rapid detection of bacterial pathogens. *Journal of Microbiological Methods*, 57:409~413
- Knudsen, G., Sørum, H., Press, C. *et al.* 1999. *In situ* adherence of marine fish pathogenic vibrios to cryosections of salmon mucosal surfaces. *Journal of Fish Disease*, 22:409~418
- Leamaster, B. R., Walsh, W. A., Brock, J. A. *et al.* 1997. Cold stress-induced changes in the aerobic heterotrophic gastrointestinal tract bacterial flora of red hybrid tilapia. *Journal of Fish Biology*, 50:770~780
- Lilly, D. M., and Stillwell, R. H. 1965. Probiotics growth promoting factors produced by micro-organisms. *Science*, 147:747~748
- Lindsay, G. J. H., and Gooday, G. W. 1985. Chitinolytic enzymes and the bacterial microflora in the digestive tract of cod, *Gadus morhua*. *Journal of Fish Biology*, 26:255~265
- Liston, J. 1957. The occurrence and distribution of bacterial types on flatfish. *J. Gen. Microbiol.* 16:205~216
- Liu, W. T., Marsh, T. L., Cheng, H. *et al.* 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:4 516~4 522
- Lovell, R. T., and Buston, J. C. 1984. Biotin supplementation of practical diets for channel catfish. *Journal of Nutrition*, 114(6):1 092~1 096
- MacDonald, N. L., Stark, J. R., and Austin, B. 1986. Bacterial microflora in the gastro-intestinal tract of Dover sole (*solea solea* L.) with emphasis on the possible role of bacteria in the nutrition of the host. *FEMS Microbiol. Lett.* 35:107~111
- MacFarlane, R. D., McLaughlin, J. J., and Bullock, G. L. 1986. Quantitative and qualitative studies of gut flora in striped bass from estuarine and coastal environments. *J. Wildl. Dis.* 22:344~348
- Margolis, L. 1953. The effect of fasting on the bacterial flora of the intestine of fish. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 10(2):95~104
- Muroga, K., Higashi, M., and Keitoku, H. 1987. The isolation of intestinal microflora of farmed red seabream (*Pagrus major*) and black seabream (*Acanthopagrus schlegelii*) at larval and juvenile stages. *Aquaculture*, 65(1):79~88
- Muyzer, G., Waal, E. C., and Uitterlinden, A. G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes encoding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:695~700
- Olafsen, J. A. 2001. Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture. *Aquaculture*, 200:223~247
- Onarheim, A. M., Wiik, R., Burghardt, J. *et al.* 1994. Characterization and identification of two *Vibrio* species indigenous to the intestine of fish in cold sea water; description of *Vibrio iliopiscarius* sp. nov. *System. Appl. Microbiol.* 17:370~379
- Panigrahi, A., Kiron, V., Puangkaew, J. *et al.* 2004. Probiotic supplementation of *Lactobacillus rhamnosus* in rainbow trout diet: Viability and innate immune response. Abstract of the Eleventh International Symposium on Nutrition and Feeding in Fish. Phuket Island, Thailand, 240
- Ring, E., and Gatesoupe, F. J. 1998. Lactic acid bacteria in fish: A review. *Aquaculture*, 160:77~203
- Sakata, T., Nakaji, M., and Kakimoto, D. 1978. Microflora in the digestive tract of marine fish. . . . General characterization of the isolates from yellow tail. *Mem. Fac. Fish.* 27:65~71
- Sakata, T., Sugita, H., Mitsuoka, T. *et al.* 1980. Isolation and distribution of obligate anaerobic bacteria from the intestines of freshwater fish. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 46:1 249~1 255
- Singh, B. R., Cuha, G., and Munshi, J. S. D. 1974. Mucous cells of the respiratory sac in an air-breathing fish, *Saccobranchius fossilis* (Bloch). *Cellule*, 70(1):5~15



- Stach, J. M., Bathe, S., Clapp, J. *et al.* 2001. PCR-SSCP comparison of 16S rDNA sequence diversity in soil DNA obtained using different isolation and purification methods. *FEMS Microbiol. Ecol.* 36:139 ~ 151
- Stephen, D. E., and Stephen, H. J. 2002. Microbiology of summer flounder *Paralichthys dentatus* fingerling production at a marine fish hatchery. *Aquaculture*, 211:9 ~ 28
- Strøm, E., and Olafsen, J. A. 1990. The indigenous microflora of wild captured juvenile cod in net-pen rearing. L. Óel, R. Microbiology in Poecilotherms, Elsevier Science Publisher (Biomedical Division), Amsterdam, 181 ~ 185
- Sugita, H., Miyajima, C., and Deguchi, Y. 1991. The vitamin B<sub>12</sub>-producing ability of the intestinal microflora of freshwater fish. *Aquaculture*, 92:267 ~ 276
- Sugita, H., Okano, R., Suzuki, Y. *et al.* 2002. Antibacterial abilities of intestinal bacteria from larval and juvenile Japanese flounder against fish pathogens. *Fisheries Science*, 68(5), 1 004 ~ 1 011
- Sugita, H., Oshima, K., and Tamura, M. 1983. Bacterial flora in the gastrointestinal of freshwater fishes in the river. *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.* 49(9):1 387 ~ 1 395
- Sugita, H., Sawasaki, J., and Deguchi, Y. 1997. Production of amylase by intestinal microflora in cultured freshwater fish. *Let. Apl. Microbiol.* 24:105 ~ 108
- Sugita, H., Tsunohara, M., Ohkoshi, T. *et al.* 1988. The establishment of an intestinal microflora in developing goldfish (*Carassius auratus*) of culture ponds. *Microb. Ecol.* 15:333 ~ 344
- Sugita, H., Tokuyama, K., and Deguchi, Y. 1985. The intestinal microflora of carp *Cyprinus carpio*, grass carp and tilapia. *Bull. Jpn. Soc. Sic. Fish.* 51:1 325 ~ 1 329
- Tanaasomwang, V., and Maroga, K. 1989. Intestinal microflora of rockfish *Sebastes schlegeli*, tiger puffer *Takifugu rubripes* and red grouper *Epinephelus akaara* at their larve and juvenile stages. *Bull. Jap. Sci. Fish.* 55(8):1 371 ~ 1 377
- Tanaka, R., Sugimura, I., Sawabe, T. *et al.* 2003. Gut microflora of abalone *Haliotis discus hannai* in culture changes coincident with a change in diet. *Fisheries Science*, 69(5):951 ~ 958
- Trust, T. J., and Bull, L. M. 1979. Obligate anaerobes bacteria in the gastrointestinal microflora of the grass carp, goldfish, and rainbow trout. *J. Fish Res. Board Can.* 36:1 174 ~ 1 179
- Venkat, H. K., Sahu, N. P., and Jain, K. K. 2004. Effect of feeding Lactobacillus-based probiotics on the gut microflora, growth and survival of postlarvae of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Aquaculture Research*, 35(5):501 ~ 507
- Verner-Jeffreys, D. W., Shields, R. J., Bricknell, I. R. *et al.* 2003. Changes in the gut-associated microflora during the development of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) larvae in three British hatcheries. *Aquaculture*, 219:21 ~ 42
- Zhou, Z., and Wang, Z. 2004. Marine fish aquaculture in China. *Asia-Pacific Marine Finfish Aquaculture Network Magazine*, 2:18 ~ 20